·基础研究·

兔骨髓间充质干细胞体外成内皮细胞能力的研究

何朝荣 张群林 黄从新

【摘要】 目的 探讨骨髓间充质干细胞体外扩增及其向内皮细胞定向分化能力。方法 无菌条件下采集兔骨髓，肝素抗凝，经淋巴细胞分层液密度梯度离心分离骨髓单个核细胞，通过贴壁培养法获得MSC，然后在内皮细胞生长环境中进行诱导分化，最后对扩增的细胞特征进行鉴定，同时初步研究其体外成血管特性。结果 MSC每扩增一代，细胞数量增加5～8倍，7.65×10^3个原代MSCs体外扩增3代即获得1.26×10^8个细胞。在70%～80%融合时呈现"铺路石"样形态，细胞免疫组化证实扩增细胞表达CD31和von Willebrand factor(vWF)，具有吞噬ac-LDL的功能，且扩增细胞在体外参与网状血管样结构形成。结论 MSC扩增能力强，在体外能诱导其向内皮细胞方向分化。

【关键词】 骨髓；分化；间充质干细胞；内皮细胞；内皮祖细胞

In vitro multiplication and differentiation into endothelial cells of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells

*HE Chaorong**, *ZHANG Qunlin*, *HUANG Congxin*

**Department of Cardiology*, *Taihe Hospital*, *Yunyang Medical College*, *Shiyan*, *Hubei* 442000, *China*

【**Abstract**】 **Objective** To explore the isolation, multiplication and differentiation into endothelial cells of bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) *in vitro*. **Methods** Rabbit bone marrow was aspirated from the iliac crest by aseptic technique with heparin. Bone marrow mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation with lymphocyte separation medium. MSCs were then obtained and cultured in endothelial cell complete medium. Specific markers were detected by immunohistochemistry and histochemistry methods. Endothelial cell characteristic function was assessed by 3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-labeled acetylated low density lipoprotein(Dil-acLDL) incorporation and vasculogenesis was also examined *in vitro*. **Results** The number of MSCs increased five- to eight-fold with each multiplication passage. 7.65×10^3 Primary MSCs multiplied in three passages to reach a number of 1.26×10^8. Cobblestone-like structure was observed at 70－80% confluence of cells. The multiplied cells exhibited typical CD31 and von Willebrand factor (vWF) staining, and uptake of Dil-acLDL. Capillary-like structure formed in two-dimensional gelatin. **Conclusion** Bone marrow MSCs can multiply vigorously and be induced to differentiate into endothelial cells *in vitro*.

【**Key words**】 bone marrow; differentiation; mesenchymal stem cell; endothelial cell; endothelial progenitor cell

研究表明体内导入促血管生长因子及其基因如VEGF、FGF等能改善缺血肢体或心肌的血液供应[1,2]，然而促血管再生因子是基于血管内皮细胞发挥作用的，老年患者常存在多器官损害或病变，而血管内皮功能失调是其病理基础，为此，本研究试图对内皮细胞进行研究，探讨骨髓细胞在体外环境中的扩增及其向内皮细胞分化能力，以证实骨髓内皮祖细胞的存在，同时对扩增细胞的体外成血管特性做初步研究。

1 材料和方法

1.1 骨髓采集及其单个核细胞分离 参照我们既往所用的方法[3]抽吸雄性新西兰白兔(体重2.5～3.5 kg)骨髓，利用淋巴细胞分层液(相对密度1.077)进行密度梯度离心，吸出乳白色细胞层(骨髓单个核细胞存在于该层)移入另一离心管中，重复离心尽可能去掉分层液。台盼蓝排斥试验检测骨髓单

作者单位：442000 十堰市，郧阳医学院附属太和医院心血管内科(何朝荣、张群林)；武汉大学附属第一医院湖北省人民医院(黄从新)

作者简介：何朝荣，女，医学硕士，副主任医师

通讯作者：何朝荣，E-mail: syhcr@.sina.com

万方数据

个核细胞活细胞数，然后调整细胞密度 1×10^7/ml，备用。整个过程严格无菌操作。

1.2 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的分离与扩增及诱导分化 骨髓单个核细胞悬液接种于纤连蛋白(fibronectin, Fn; Calbiochem)预先包被培养瓶，置于37℃、5% CO_2 孵育箱中培养，24 h后吸出未贴壁的细胞悬液至另一培养瓶中继续贴壁培养。由于首先贴壁的细胞中含有少数自骨髓基膜脱落的成熟内皮细胞，弃掉第一个24 h内贴壁细胞即可以排除成熟内皮细胞的影响。于第4天弃掉未贴壁细胞，所获得的贴壁细胞为骨髓MSC[4]，更换培养液(M199+20%FCS+PG 100 U/ml+SM 100 μg/ml)时加入牛垂体内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement from bovine pituitary, ECGS; Sigma)30μg/ml，对MSC进行定向诱导分化，3 d更换一次培养液。2周左右贴壁细胞达到80%融合时，用1:1的2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA混合液消化，以 7.65×10^3/cm^2 进行细胞传代，相同条件培养传代细胞，每间隔3 d即可以进行下次传代。取扩增细胞以 7.65×10^3/cm^2 接种于放有消毒盖片的培养皿中，制备细胞爬片。

对照组细胞在贴壁培养第4天换液(M199+20%FCS+PG 100 U/ml+SM 100 μg/ml)时不加ECGS，同样3 d更换一次培养液。4周左右贴壁延展细胞才能70%～80%融合，按以上方法制备细胞爬片。

1.3 内皮细胞鉴定 ①形态学观察：体外扩增细胞直接于倒置相差显微镜下观察。②免疫组织化学实验参照 Elivision™二步法试剂盒(福州迈新生物技术公司)提供的方法检测细胞CD31和vWF的表达。孵育24 h后取出细胞爬片经40 g/L的多聚甲醛固定，PBS洗涤后3 g/L H_2O_2 封闭以消除内源性过氧化物酶活性。正常非免疫血清室温孵育10 min后加入抗CD31鼠单抗工作液(福州迈新生物技术公司)50 μl，置于湿盒中4℃过夜，PBS洗涤后加50μl辣根过氧化物酶聚合物标记的羊抗鼠IgG/Bio工作液，室温下孵育30 min后经PBS洗涤DAB试剂盒显色，苏木素复染。抗Ⅷ相关抗原vWF兔多抗工作液作为一抗代替抗CD31鼠单抗(福州迈新生物技术公司)，二抗为辣根过氧化物酶聚合物标记的羊抗兔IgG/Bio工作液，同样DAB试剂盒显色，苏木素复染，以检测细胞vWF的表达。阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗。对照组细胞同样检测CD31和vWF的表达。③内皮细胞功能检测：贴壁细胞60%融合更换培养基时加入四甲基吲哚碳花青探针标记乙酰化低密度脂蛋白(3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate labeled acetylated low density lipoprotein, Dil-acLDL; BTI) 10 μg/ml，置于37℃、5% CO_2 孵育箱中孵育4 h，尔后用无荧光的PBS洗涤细胞2次，直接荧光显微镜下观察，激发光波长547 nm经过若丹明光栅激发荧光素Dil。

1.4 体外血管生成模型 在明胶二维培养环境中诱导毛细血管样结构[5]。ECGS诱导扩增细胞接近完全融合时，掺入Dil-acLDL 10 μg/ml，37℃孵育4 h，用无荧光的PBS洗涤2次，经1:1的2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA混合液消化，将富含Dil标记细胞重悬于1 ml 2×M199(含FCS)中，然后加入1 ml 40 g/L明胶，充分混匀(最终细胞密度为 1×10^6/ml)后接种于24孔培养板，每孔100 μl，37℃孵育2 h使明胶聚合，最后每孔加入900 μl完全培养基(含ECGS，肝素)，继续孵育。动态观察细胞层的结构变化。

2 结 果

2.1 MSC的体外扩增及诱导分化 骨髓细胞体外培养时仅有少数细胞贴壁，贴壁细胞以大小相对均一的圆形细胞为主，散在存在，其贴壁率大约为0.01%。在内皮细胞生长环境中24 h内部分细胞胞体延展，呈梭形生长，随后迅速增殖并出现小细胞集落，10 d左右典型细胞簇形成，中心为圆形细胞，周边细胞呈梭形生长，并且中心细胞不断脱落，这一结构类似于鸦外胚层细胞体外培养时血岛样细胞集落形成[6]。2周时细胞70%～80%融合时呈现典型的"铺路石"样结构(图1)。

每瓶单层融合的骨髓MSC经1:1的2.5g/L胰蛋白酶和0.2g/L EDTA混合液消化后，获得 $(9.21\pm0.53)\times10^6$ 个细胞，传代培养细胞增殖迅速，4 d左右达到融合，继续传代扩增。7.65×10^3 个原代MSCs体外扩增3代即获得 1.26×10^8 个细胞。

无ECGS诱导的对照组贴壁延展细胞也呈梭形，但细胞排列为栅栏状和漩涡状，其增殖缓慢，10 d左右才出现细胞数目的增加，4周时接近融合。

2.2 内皮细胞特性鉴定 ①细胞免疫组织化学鉴定结果：在诱导骨髓MSCs向内皮细胞分化过程中，细胞免疫组化证实未经ECGS诱导普通条件下培养的细胞不表达CD31和vWF，而ECGS诱导的各代细胞CD31和vWF呈阳性表达，在这些细胞中CD31的表达弱于vWF的表达，且CD31阳性细胞表现为胞浆弥漫性着色，vWF阳性细胞为胞浆和胞核的同

万方数据

时着色(图2)。②内皮细胞吞噬功能:ECGS诱导的原代和传代细胞在掺入Dil-acLDL后,均可见到发出红色荧光的Dil阳性细胞(图3);未经ECGS诱导的梭形细胞不吞噬Dil-acLDL,在荧光显微镜下观察无红色荧光细胞。

2.3 体外诱导毛细血管样结构 ECGS诱导扩增细胞在明胶二维结构中,12 h内呈现索状结构,2 d后类管状结构形成,10 d左右趋于典型,呈纵横交错网络状结构,Dil阳性细胞参与毛细血管样结构形成(图4)。

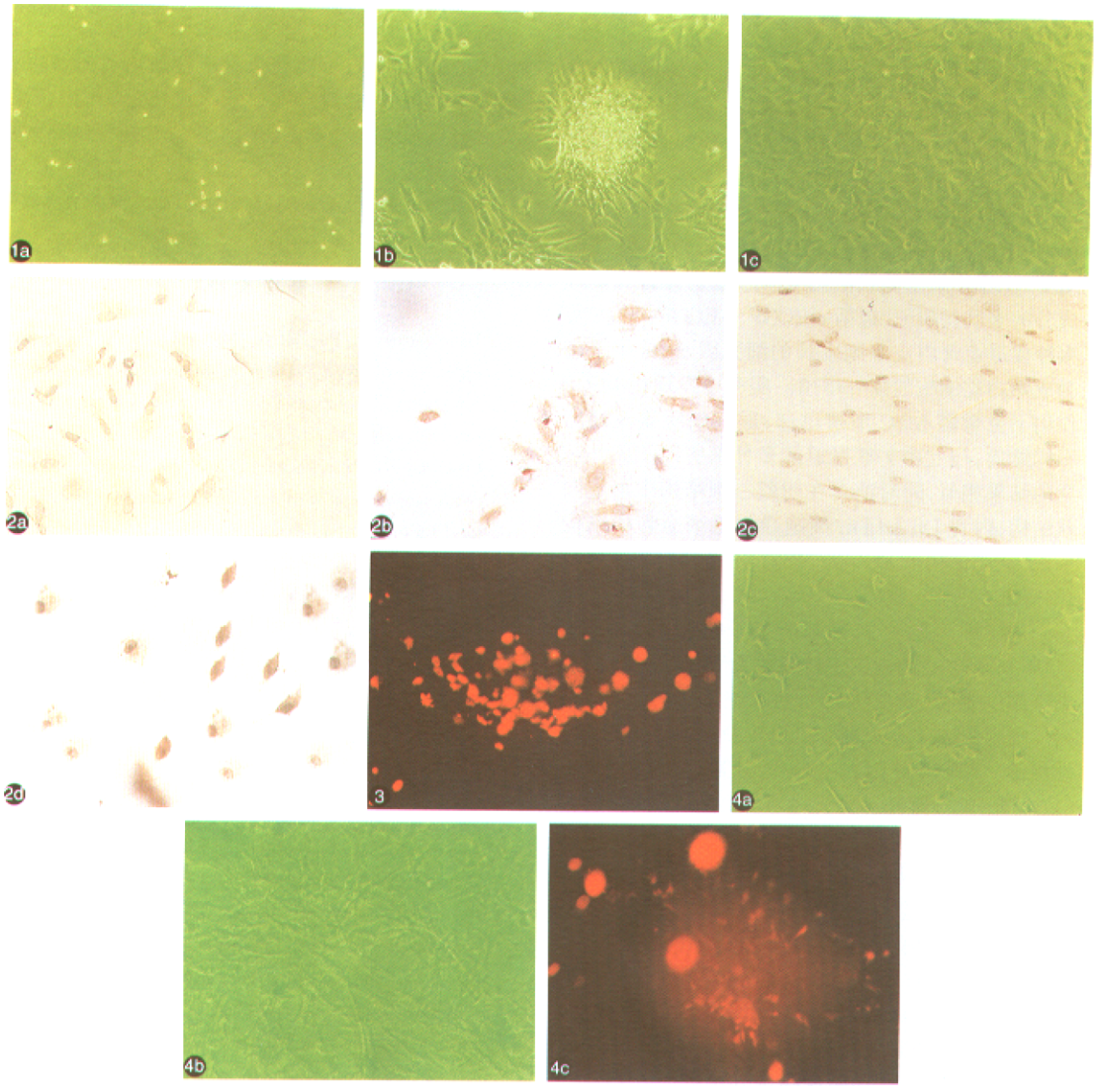


图1 骨髓间充质干细胞在ECGS作用下诱导分化为内皮细胞的形态特点(倒置相差显微镜,×100)
1a. 未延展的贴壁细胞;**1b.** 1周时的梭形细胞及细胞簇形成;**1c.** 2周左右呈现"铺路石"样结构

图2 MSC定向分化过程中CD31和vWF的表达(DAB显色,×200)
2a. 未经诱导的MSC CD31染色;**2b.** 诱导后的MSC CD31染色;**2c.** 未经诱导的MSC vWF染色;**2d.** 诱导后的MSC vWF染色

图3 内皮细胞吞噬Dil-acLDL(荧光显微镜,×100)

图4 体外诱导的内皮细胞在明胶二维结构中形成毛细血管样结构
4a. 12 h形成索状结构(相差显微镜,×100);**4b.** 10 d左右的网状结构(相差显微镜,×200);**4c.** Dil阳性细胞参与网状结构形成(荧光显微镜,×100)

万方数据

3 讨 论

本研究证实了贴壁生长的骨髓 MSC 在特定环境中易于扩增并诱导分化出有功能的内皮细胞，后者参与体外毛细血管样结构形成。

骨髓 MSC 自我更新及其增殖、分裂、分化与迁移等功能受细胞内外多因素调节。细胞因子通过多种途径影响细胞行为。目前 MSC 的体外诱导分化常联合应用多种细胞因子，如 Reyes 等[7]同时应用 SCF，LIF，IGF 和 bFGF 诱导人的骨髓细胞，最终骨髓 MSC 分化出内皮样细胞；Qun 等[8]联合 VEGF、IGF-1、bFGF 作用于贴壁 CD34$^+$ 细胞同样诱导分化出内皮细胞。我们应用 ECGS 诱导分化兔骨髓 MSC，从小牛脑垂体提取的 ECGS 是一种含有多种成分的多肽丝裂原，包括 α-ECGF、β-ECGF、aFGF 等多种促进血管内皮细胞生长的细胞因子，常用于刺激成熟内皮细胞的体外增殖。实验中发现在 ECGS 作用下兔骨髓 MSC 增殖迅速，形成细胞簇及鹅卵石样结构，与上述文献报道的多种细胞因子体外诱导的结果相似，同时前者在明胶二维结构中形成网状结构，内吞 Dil-acLDL 细胞参与毛细血管样结构形成，从而证实了 ECGS 对骨髓 MSC 的定向诱导分化作用。

内皮细胞鉴定需要结合多个指标综合判断。CD31 和 vWF 是内皮细胞特异性表面抗原；acLDL 借助于内皮细胞表面 LDL 受体进入胞浆，吞噬 acLDL 是内皮细胞的特有功能，是识别内皮细胞的另一个特异性指标。本研究中 ECGS 诱导的骨髓 MSC 不仅表达 CD31 和 vWF，而且还具有内吞 acLDL 的功能，结合细胞生长过程中的形态特点及诱导分化细胞的体外成血管特性，足以证实 ECGS 诱导分化的细胞为内皮细胞，同时也意味骨髓 MSC 中含有一定数量的具有内皮分化潜能的内皮祖细胞。

目前人们对内皮祖细胞的认识尚处于初步阶段，如何分离并纯化内皮祖细胞尚未取得突破性进展。细胞表面抗原如 CD34、AC133、Flk1 等作为内皮祖细胞独特标志，用磁珠筛选方法筛选出 CD34$^+$ Flk1$^+$ 或 CD34$^+$ AC133$^+$ 细胞，由于部分细胞吞噬大量磁珠，其生长和增殖活力下降，细胞克隆形成率低；采用流式细胞分类筛选仪可以得到成分相对单一的细胞，但对设备要求较高，不易推广；而且 CD34$^-$ 细胞同样能分化出内皮样细胞[9~11]。我们应用密度梯度离心、贴壁筛选和特定环境诱导分化等相结合的方法，同样获得大量的内皮细胞，并且操作步骤相对简单，不失为研究内皮祖细胞的一种较好的方法。

Takahashi 等[12]研究发现，缺血刺激或促血管生长因子是动员骨髓内皮祖细胞进入血液的重要因素。动员骨髓内皮祖细胞进入血液以提高循环内皮祖细胞数目，抑或利用自体内皮祖细胞移植来修复功能受损的血管内皮，改善血管内皮功能，促进缺血组织的血管新生，可能成为难治性缺血性血管疾病的一个治疗方向，对存在血管内皮细胞功能失调累及多器官损害的老年疾病的治疗方案选择具有重要的指导意义。

致谢：本研究得到华中科技大学同济医学院冯克燕教授的精心指导，在此深表感谢。

参 考 文 献

1 Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation, 1998, 97: 1114-1123.

2 Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. Lancet, 2002, 359: 2053-2058.

3 何朝荣，刘先军，严世荣，等. 端粒酶活性在骨髓间充质干细胞体外分化过程中的表达观察. 基础医学与临床，2003，23：431-435.

4 Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol, 2000, 28: 875-884.

5 Viñals F, Pouysségur J. Transforming growth factor β1 (TGF-β1) promotes endothelial cell survival during *in vitro* angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-α signaling. Mol Cell Biol, 2001, 21: 7218-7230.

6 Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis *in vitro*. Development, 1992, 116: 435-439.

7 Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. Blood, 2001, 98: 2615-2625.

8 Qun S, Rafii S, Moses HD, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood, 1998, 92: 362-367.

9 Harraz M, Chunhua J, Hanlon HD, et al. CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors. Stem Cells, 2001, 21: 304-312.

10 Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest, 2002, 109: 337-346.

万方数据

11 Asahara T, Murohara T, Alison S, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science, 1997, 275:964-967.

12 Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovasculation. Nat Med, 1999, 5:434-438.

(收稿日期:2003-05-23)
(本文编辑 张和起)

·经验交流·

老年人糖尿病合并肺结核临床分析

赵建荣 邓光贵 王玲

近年来糖尿病合并肺结核的发病率呈逐年上升趋势,报道已达到19.3%~24.1%。本文回顾分析了老年人群两病并存时的临床特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自楚雄州人民医院1999年1月至2002年7月糖尿病合并肺结核的患者54例。老年组34例,年龄在60~78岁,平均67.8岁。非老年组20例,年龄在19~59岁,平均38.3岁。两组结核平均病程相近。

1.2 临床表现 糖尿病分型老年组均诊断为2型糖尿病,非老年组18例诊断为2型糖尿病,2例诊断为1型糖尿病。肺结核分类:按1998年中国结核病分类法,老年组/非老年组:Ⅱ型肺结核4/4,Ⅲ型肺结核26/14,Ⅳ型肺结核4/2,老年组痰涂片(+)18例,培养(+)10例,非老年组痰涂片(+)6例,培养(+)2例。两组痰菌阳性率比较无显著性差异($0.25>P>0.05$)。按两病并发时结核病变程度划分标准:轻度,无空洞病变,病灶范围相加≤2个肺野;中度,有空洞病变,病灶范围相加≤2个肺野;重度,有空洞病变,病灶范围相加>2个肺野。老年组/非老年组分别为:轻度4/10,中度10/8,重度20/2。两组比较,重度病变有显著性差异($P<0.025$),空洞无显著性差异($0.25>P>0.05$)。

1.3 方法 按2S(或2E)HR/7HR或2S(或E)HRZ/4HR化疗(S:链霉素;E:乙胺丁醇;H:异烟肼;R:利福平;Z:吡嗪酰胺),同时规律降血糖治疗。观察经2~4个月联合治疗后肺部结核病灶的X线影像/CT影像学变迁。

2 结 果

经2~4个月联合治疗,按亚太地区血糖控制标准划分为良好组(空腹血糖<6.0 mmol/L,餐后2 h血糖<8.0 mmol/L)28例,中等组17例,差组(空腹血糖>7.8 mmol/L,餐后2 h血糖>10.0 mmol/L)9例。老年组/非老年组分别为:良好组19/9,中等组11/6,差组4/5。病灶吸收好转和病灶增大在三组血糖控制标准下老年组/非老年组分别为:良好组15/8,1/0;中等组5/3,2/1;差组1/1,2/1。相同血糖组,病灶吸收好转、病灶无变化及病灶增大相似($P>0.05$)。除外年龄因素血糖良好组与其他两组的病灶恶化率(病灶无变化+病灶增大的比率,17.86% vs 57.69%)比较有显著差异($P<0.05$)。

3 讨 论

糖尿病病人并发肺结核的概率较正常人高3~5倍。近年来老年糖尿病罹患结核呈上升趋势。本组资料显示老年糖尿病并发肺结核高达62.96%,和非老年组比较病变广泛,融合病变较多见(重度58.82% vs 10%),痰菌阳性率(82.35% vs 40%)及空洞(88.24% vs 50%)有增多趋势,与文献报道极相似。经化疗及降血糖治疗后老年组与非老年组病灶变化情况相似,即系统治疗对老年患者一样有效。除外年龄因素,血糖良好组病变恶化率低,提示高血糖状况可影响老年组与非老年组肺部结核病灶的吸收好转,与文献报道一致。因此,不论老年组与非老年组,良好的血糖控制状态,均有利于充分发挥化疗的积极作用,效果良好。

(收稿日期:2002-12-10)
(本文编辑 张和起)

作者单位:675000 楚雄市,云南楚雄州人民医院内分泌科(赵建荣、王玲);感染科(邓光贵)
作者简介:赵建荣,男,学士学位,主治医师
通讯作者:赵建荣,电话:13013428027

万方数据